



(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) **Offenlegungsschrift**
(10) **DE 100 65 632 A 1**

(51) Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68
G 01 N 21/64

(21) Aktenzeichen: 100 65 632.3
(22) Anmeldestag: 29. 12. 2000
(43) Offenlegungstag: 15. 11. 2001

(66) Innere Priorität:
100 23 421. 6 12. 05. 2000

(72) Erfinder:
Rigler, Rudolf, Prof. Dr., Danderyd, SE; Földes-Papp,
Zeno, Dr., Graz, AT

(71) Anmelder:
SMTech BioVision Holding AG, Ecublens, CH
(74) Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- (54) Verfahren zum Nachweis von Polynukleotiden
(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Polynukleotiden auf einem Träger, wobei der Träger eine Vielzahl von separaten Nachweisbereichen mit jeweils unterschiedlichen Polynukleotiden enthält. Die Polynukleotide in den Nachweisbereichen liegen - im Gegensatz zu bekannten DNA-Chip-Testformaten - in einer nicht an den Träger gebundenen Form vor. Weiterhin wird eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens offenbart.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DE 100 65 632 A 1

1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Polynukleotiden auf einem Träger, wobei der Träger eine Vielzahl von separaten Nachweisbereichen mit jeweils unterschiedlichen Polynukleotiden enthält. Die Polynukleotide in den Nachweisbereichen liegen – im Gegensatz zu bekannten DNA-Chip-Testformaten – in einer nicht an den Träger gebundenen Form vor. Weiterhin wird eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens offenbart.

[0002] Die Verwendung sogenannter DNA-Chips zur Bestimmung von Polynukleotiden ist bekannt (siehe z. B. europäische Patente EP 0 373 203 und 0 619 321). DNA-Chips des Standes der Technik enthalten eine Vielzahl separater Nachweisbereiche auf der Oberfläche eines Trägers, die jeweils unterschiedliche Polynukleotide in einer trägergebundenen Form enthalten. Ein Nachteil dieser DNA-Chips besteht jedoch darin, dass sich die Reaktivität der auf dem Träger immobilisierten Polynukleotide signifikant von der Reaktivität freier Polynukleotide, wie sie in biologischen Systemen vorliegen, unterscheidet. Dies führt zu grundsätzlichen Problemen bei der Auswertung von Hybridisierungsexperimenten unter Verwendung gängiger DNA-Chips.

[0003] Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, neue Verfahren zur Bestimmung von Polynukleotiden bereitzustellen, die einerseits eine vergleichbare Effizienz wie gängige DNA-Chips aufweisen, bei denen aber andererseits die mit der Verwendung immobilisierter Polynukleotide auftretenden Nachteile beseitigt sind.

[0004] Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von Polynukleotiden, umfassend die Schritte:

- (i) Bereitstellen eines Trägers, der mehrere separate Nachweisbereiche enthält, in denen sich jeweils ein Polynukleotid befindet, wobei das Polynukleotid in einer nicht an den Träger gebundenen Form vorliegt,
- (ii) Inkontaktbringen der in den Nachweisbereichen befindlichen Polynukleotide mit Nachweissonden, wobei in einzelnen Nachweisbereichen jeweils verschiedene Kombinationen von Polynukleotid und Nachweissonde vorhanden sind, und
- (iii) Bestimmen einer Hybridisierung der Polynukleotide mit den Nachweissonden.

[0005] Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass die Hybridisierung der zu untersuchenden Polynukleotide mit Nachweissonden in sehr geringen Messvolumina und bei sehr geringen Konzentrationen der Reaktionspartner durchgeführt werden kann. Hierzu wird vorzugsweise das im europäischen Patent 0 679 251 beschriebene Verfahren der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) oder ein anderes fluoreszenzspektroskopisches Verfahren mit ausreichender Sensitivität verwendet. Dies FCS umfasst vorzugsweise die Messung von einem oder wenigen Probenmolekülen in einem Messvolumen, wobei die Konzentration der zu bestimmenden Moleküle $\leq 10^{-6}$ mol/l beträgt und das Messvolumen vorzugsweise $\leq 10^{-14}$ l ist. Die Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie umfasst die Bestimmung stoffspezifischer Parameter, die durch Lumineszenzmessungen an den zu bestimmenden Molekülen ermittelt werden. Bei diesen Parametern kann es sich um Translationsdiffusionskoeffizienten, Rotationsdiffusionskoeffizienten oder/und um die Exzitationswellenlänge, die Emissionswellenlänge oder/und die Lebensdauer eines angeregten Zustandes eines lumineszierenden Substituenten oder die Kombination dieser Messgrößen handeln.

Auf Einzelheiten zur Verfahrensdurchführung und apparative Details zu den für das Verfahren verwendeten Vorrichtungen wird auf die Offenbarung des europäischen Patents 0 679 251 verwiesen.

- 5 [0006] Alternativ kann auch eine Fluoreszenzabklingmessung durchgeführt werden, wobei man die Relaxationszeit der Fluoreszenzmarkierung bestimmt, oder das Auftreten von Energietransfer- oder Quenchvorgängen bestimmt werden.
- 10 [0007] Die in den Nachweisbereichen des Trägers angeordneten Polynukleotide sind vorzugsweise Nukleinsäuren wie DNA oder RNA, wobei DNA-Polynukleotide besonders bevorzugt sind. Andererseits können als Polynukleotide auch Nukleinsäureanaloga, wie etwa Peptidnukleinsäuren (PNA), eingesetzt werden. Die Polynukleotide können einerseits aus natürlichen Quellen stammen, z. B. aus Gen- oder cDNA-Bibliotheken, und Gene, cDNA-Moleküle oder Fragmente davon sein, andererseits kann es sich jedoch auch um synthetisch erzeugte, z. B. kombinatorische Polynukleotidsequenzen handeln. Die Polynukleotide liegen in einer Form vor, die unter den Bedingungen des Nachweisverfahrens mit einer komplementären Nachweissonde hybridisieren kann. Vorzugsweise liegen die Polynukleotide in einzelsträngiger Form vor.
- 15 [0008] Der Träger enthält bevorzugt mehrere Nachweisbereiche, in denen sich jeweils ein Polynukleotid mit unterschiedlicher Sequenz befindet. Es ist jedoch auch möglich, einen Träger mit mehreren Nachweisbereichen zu verwenden, die jeweils ein Polynukleotid mit gleicher Sequenz enthalten. In diesem Falle muss für jeden dieser Nachweisbereiche eine andere Nachweissonde eingesetzt werden. Die Länge der Polynukleotide in den Nachweisbereichen beträgt vorzugsweise mindestens 10 Nukleotide bis zu mehreren tausend Nukleotiden.
- 20 [0009] Die zur Untersuchung einer Hybridisierung mit den in den Nachweisbereichen befindlichen Polynukleotiden verwendeten Nachweissonden können – ebenso wie die Polynukleotide selbst – aus natürlichen oder synthetischen Quellen stammen. Die Nachweissonden tragen vorzugsweise eine oder mehrere Markierungsgruppen, diese Markierungsgruppen können während der Synthese der Nachweissonden (insbesondere bei chemischer Synthese oder bei Amplifikation) oder auch im Anschluss an die Synthese der Nachweissonden (z. B. durch enzymatische Anfügung am 5'- oder 3'-Ende) eingeführt werden. So können markierte Nachweissonden z. B. durch reverse Transkription von RNA-Molekülen, z. B. von mRNA-Molekülen unter Verwendung markierter Primer, oder durch enzymatische Primerextension unter Verwendung markierter Nukleotidbausteine erzeugt werden.
- 25 [0010] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Polynukleotide verwendet, die an einen Mikropartikel gekoppelt sind. Dieser Mikropartikel hat eine Größe, die ausreicht, um die Diffusionsgeschwindigkeit eines daran gekoppelten Polynukleotids zu verlangsamen. Andererseits ist der Mikropartikel aber auch ausreichend klein genug, um sicherzustellen, dass das daran gekoppelte Polynukleotid in seinem Reaktionsverhalten im Wesentlichen einem "freien", nicht aber einen "immobilisierten" Polynukleotid entspricht. Die Größe der Mikropartikel ist vorzugsweise $\leq 1 \mu\text{m}$, besonders bevorzugt 10 nm bis 500 nm. Bei den Mikropartikeln kann es sich um Latexpartikel z. B. aus Polystyrol oder anderen Polymeren, Metallsolpartikel, Silika-, Quarz- oder Glaspartikel handeln.
- 30 [0011] Die Bindung von Polynukleotiden an Mikropartikel kann durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Beispielsweise kann die Bindung der Polynukleotide an den Mikropartikel durch hochaffine Wechselwirkungen
- 35 [0012] Die zur Untersuchung einer Hybridisierung mit den in den Nachweisbereichen befindlichen Polynukleotiden verwendeten Nachweissonden können – ebenso wie die Polynukleotide selbst – aus natürlichen oder synthetischen Quellen stammen. Die Nachweissonden tragen vorzugsweise eine oder mehrere Markierungsgruppen, diese Markierungsgruppen können während der Synthese der Nachweissonden (insbesondere bei chemischer Synthese oder bei Amplifikation) oder auch im Anschluss an die Synthese der Nachweissonden (z. B. durch enzymatische Anfügung am 5'- oder 3'-Ende) eingeführt werden. So können markierte Nachweissonden z. B. durch reverse Transkription von RNA-Molekülen, z. B. von mRNA-Molekülen unter Verwendung markierter Primer, oder durch enzymatische Primerextension unter Verwendung markierter Nukleotidbausteine erzeugt werden.
- 40 [0013] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Polynukleotide verwendet, die an einen Mikropartikel gekoppelt sind. Dieser Mikropartikel hat eine Größe, die ausreicht, um die Diffusionsgeschwindigkeit eines daran gekoppelten Polynukleotids zu verlangsamen. Andererseits ist der Mikropartikel aber auch ausreichend klein genug, um sicherzustellen, dass das daran gekoppelte Polynukleotid in seinem Reaktionsverhalten im Wesentlichen einem "freien", nicht aber einen "immobilisierten" Polynukleotid entspricht. Die Größe der Mikropartikel ist vorzugsweise $\leq 1 \mu\text{m}$, besonders bevorzugt 10 nm bis 500 nm. Bei den Mikropartikeln kann es sich um Latexpartikel z. B. aus Polystyrol oder anderen Polymeren, Metallsolpartikel, Silika-, Quarz- oder Glaspartikel handeln.
- 45 [0014] Die Bindung von Polynukleotiden an Mikropartikel kann durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Beispielsweise kann die Bindung der Polynukleotide an den Mikropartikel durch hochaffine Wechselwirkungen
- 50 [0015] Die zur Untersuchung einer Hybridisierung mit den in den Nachweisbereichen befindlichen Polynukleotiden verwendeten Nachweissonden können – ebenso wie die Polynukleotide selbst – aus natürlichen oder synthetischen Quellen stammen. Die Nachweissonden tragen vorzugsweise eine oder mehrere Markierungsgruppen, diese Markierungsgruppen können während der Synthese der Nachweissonden (insbesondere bei chemischer Synthese oder bei Amplifikation) oder auch im Anschluss an die Synthese der Nachweissonden (z. B. durch enzymatische Anfügung am 5'- oder 3'-Ende) eingeführt werden. So können markierte Nachweissonden z. B. durch reverse Transkription von RNA-Molekülen, z. B. von mRNA-Molekülen unter Verwendung markierter Primer, oder durch enzymatische Primerextension unter Verwendung markierter Nukleotidbausteine erzeugt werden.
- 55 [0016] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Polynukleotide verwendet, die an einen Mikropartikel gekoppelt sind. Dieser Mikropartikel hat eine Größe, die ausreicht, um die Diffusionsgeschwindigkeit eines daran gekoppelten Polynukleotids zu verlangsamen. Andererseits ist der Mikropartikel aber auch ausreichend klein genug, um sicherzustellen, dass das daran gekoppelte Polynukleotid in seinem Reaktionsverhalten im Wesentlichen einem "freien", nicht aber einen "immobilisierten" Polynukleotid entspricht. Die Größe der Mikropartikel ist vorzugsweise $\leq 1 \mu\text{m}$, besonders bevorzugt 10 nm bis 500 nm. Bei den Mikropartikeln kann es sich um Latexpartikel z. B. aus Polystyrol oder anderen Polymeren, Metallsolpartikel, Silika-, Quarz- oder Glaspartikel handeln.
- 60 [0017] Die Bindung von Polynukleotiden an Mikropartikel kann durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Beispielsweise kann die Bindung der Polynukleotide an den Mikropartikel durch hochaffine Wechselwirkungen
- 65 [0018] Die zur Untersuchung einer Hybridisierung mit den in den Nachweisbereichen befindlichen Polynukleotiden verwendeten Nachweissonden können – ebenso wie die Polynukleotide selbst – aus natürlichen oder synthetischen Quellen stammen. Die Nachweissonden tragen vorzugsweise eine oder mehrere Markierungsgruppen, diese Markierungsgruppen können während der Synthese der Nachweissonden (insbesondere bei chemischer Synthese oder bei Amplifikation) oder auch im Anschluss an die Synthese der Nachweissonden (z. B. durch enzymatische Anfügung am 5'- oder 3'-Ende) eingeführt werden. So können markierte Nachweissonden z. B. durch reverse Transkription von RNA-Molekülen, z. B. von mRNA-Molekülen unter Verwendung markierter Primer, oder durch enzymatische Primerextension unter Verwendung markierter Nukleotidbausteine erzeugt werden.
- 70 [0019] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden Polynukleotide verwendet, die an einen Mikropartikel gekoppelt sind. Dieser Mikropartikel hat eine Größe, die ausreicht, um die Diffusionsgeschwindigkeit eines daran gekoppelten Polynukleotids zu verlangsamen. Andererseits ist der Mikropartikel aber auch ausreichend klein genug, um sicherzustellen, dass das daran gekoppelte Polynukleotid in seinem Reaktionsverhalten im Wesentlichen einem "freien", nicht aber einen "immobilisierten" Polynukleotid entspricht. Die Größe der Mikropartikel ist vorzugsweise $\leq 1 \mu\text{m}$, besonders bevorzugt 10 nm bis 500 nm. Bei den Mikropartikeln kann es sich um Latexpartikel z. B. aus Polystyrol oder anderen Polymeren, Metallsolpartikel, Silika-, Quarz- oder Glaspartikel handeln.
- 75 [0020] Die Bindung von Polynukleotiden an Mikropartikel kann durch kovalente oder nicht-kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Beispielsweise kann die Bindung der Polynukleotide an den Mikropartikel durch hochaffine Wechselwirkungen

2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

zwischen den Partnern eines spezifischen Bindepaares, z. B. Biotin/Streptavidin oder Avidin, Hapten/Anti-Hapten-Antikörper, Zucker/Lectin etc. vermittelt werden. So können biotinylierte Polynukleotide an Streptavidin-beschichtete Mikropartikel gekoppelt werden. Alternativ können auch die Polynukleotide adsorptiv an Partikel gebunden werden. So kann eine Bindung von durch Einbau von Alkanthiogruppen modifizierten Polynukleotiden an Metallpartikel, z. B. Goldpartikel, erfolgen. Noch eine weitere Alternative ist die kovalente Immobilisierung, wobei die Bindung der Polynukleotide über reaktive Silangruppen auf einer Silikoberfläche vermittelt werden kann. Gegebenenfalls können alternativ oder zusätzlich auch an Mikropartikel gekoppelte Nachweissonden eingesetzt werden.

[0011] Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Polynukleotide bzw. Nachweissonden durchträgergebundene Synthese am Partikel unter Verwendung bekannter Festphasensynthesemethoden herzustellen.

[0012] An einen Mikropartikel kann ein einziger Polynukleotidstrang gebunden werden. Es können jedoch auch mehrere, z. B. bis zu mehreren tausend Polynukleotidstränge an einen Partikel gebunden werden. Die Bindung erfolgt vorzugsweise über den 5'- oder den 3'-Terminus des Polynukleotidstrangs.

[0013] Für das erfindungsgemäße Verfahren wird ein Träger mit mehreren, vorzugsweise mit einer Vielzahl von 10^2 oder mehr separaten Nachweisbereichen verwendet. Die Nachweisbereiche sind so ausgestaltet, dass sie eine Hybridisierung des Polynukleotids mit der Nachweissonde in Lösung ermöglichen. Vorzugsweise handelt es sich bei den Nachweisbereichen um Vertiefungen in der Trägeroberfläche, wobei diese Vertiefungen grundsätzlich eine beliebige Form aufweisen können, z. B. kreisförmig, quadratisch, rautenförmig etc. Vorzugsweise enthalten die Nachweisbereiche ein Volumen von $\leq 10^{-6}$ l und besonders bevorzugt von $\leq 10^{-8}$ l. Der Träger enthält vorzugsweise 10^{-3} l oder mehr, besonders bevorzugt 10^{-4} l oder mehr separate Nachweisbereiche.

[0014] Bevorzugte Konzentrationen der zu bestimmenden Polynukleotide in den Nachweisbereichen sind $\leq 10^{-6}$ mol/l, besonders bevorzugt 10^{-10} bis 10^{-14} mol/l, während die Nachweissonden in einer Konzentration von vorzugsweise $\leq 10^{-4}$ mol/l, besonders bevorzugt 10^{-8} mol/l bis 10^{-11} mol/l angeboten werden.

[0015] Für das erfindungsgemäße Verfahren werden vorzugsweise markierte Nachweissonden verwendet, wobei durch Lumineszenzmessungen nachweisbare Markierungen, insbesondere durch Fluoreszenzmessung nachweisbare Markierungen bevorzugt sind. Wenn die in einem Nachweisbereich verwendete Nachweissonde mit dem dort befindlichen Polynukleotid hybridisiert, findet aufgrund dieser Hybridisierung eine nachweisbare Änderung eines stoffspezifischen Parameters statt. Diese nachweisbare Änderung kann durch Fluoreszenzmessung gemessen werden. So erfolgt beispielsweise bei Hybridisierung von Nachweissonde und Polynukleotid eine nachweisbare Mobilitätsverringerung des Hybrids gegenüber den Ausgangskomponenten. Alternativ oder zusätzlich kann auch das Auftreten von Quench- oder Energietransfervorgängen bei der Hybridisierung nachgewiesen werden. Solche Energietransfervorgänge treten beispielsweise bei Verwendung mehrerer verschiedener markierter Sonden bzw. markierter Polynukleotide und markierter Sonden auf.

[0016] Beispielsweise kann die Detektion mittels konfokaler Einzelmoleküldetektion wie etwa durch Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie gemäß EP 0 679 251 erfolgen, bei der ein sehr kleines, vorzugsweise ein konfokales Volumenelement, beispielsweise $0,1 \times 10^{-15}$ bis 20×10^{-12} l dem

Anregungslicht eines Lasers ausgesetzt wird, das die in diesem Messvolumen befindlichen fluoreszenzmarkierten Nachweissonden zur Emission von Fluoreszenzlicht anregt, wobei das emittierte Fluoreszenzlicht mittels eines Fotodetektors gemessen wird und eine Korrelation zwischen der zeitlichen Veränderung der gemessenen Emission und der Mobilität der Fluoreszenzmarkierungsgruppe bestimmt werden kann. Die konfokale Einzelmolekülbestimmung ist weiterhin bei Rigler und Mets (Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng. 1921 (1993), 239 ff.) und Mets und Rigler (J. Fluoresc. 4 (1994), 259–264) beschrieben.

[0017] Alternativ bzw. zusätzlich kann die Detektion auch durch eine zeitaufgelöste Abklingmessung, ein sogenanntes Time Gating erfolgen, wie beispielsweise von Rigler et al.

[0018] Picosecond Single Photon Fluorescence Spectroscopy of Nucleic Acids, in: "Ultrafast Phenomena", D. H. Auston ed. Springer 1984, beschrieben. Dabei erfolgt die Anregung der Fluoreszenzmoleküle innerhalb eines Messvolumens und anschließend – vorzugsweise in einem zeitlichen Abstand von ≥ 100 ps – das Öffnen eines Detektionsintervalls am Photodetektor. Auf diese Weise können durch Ramaneffekte erzeugte Hintergrundsignale ausreichend gering gehalten werden, um eine im Wesentlichen störungsfreie Detektion zu ermöglichen. Das Timegating ist besonders zur Messung von Quench- oder Energietransfervorgängen geeignet.

[0019] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens kann die Bestimmung auch die Messung eines kreuzkorrelierten Signals umfassen, das von einem mindestens 2 unterschiedlichen Markierungen, insbesondere Fluoreszenzmarkierungen, enthaltenden Sonden-Polynukleotidkomplex stammt, wobei mehrere unterschiedlich markierte Sonden oder/und Polynukleotide mit jeweils unterschiedlichen Markierungen eingesetzt werden können. Diese Kreuzkorrelationsbestimmung ist beispielsweise bei Schwille et. al. (Biophys.J. 72 (1997), 1878–1886) und Rigler et. al. (J. Biotechnol. 63 (1998), 97–109) beschrieben.

[0020] Der für das Verfahren verwendete Träger sollte so ausgestaltet sein, dass er eine optische Detektion in den Nachweisbereichen ermöglicht. Vorzugsweise wird daher ein zumindest in den Nachweisbereichen optisch transparenter Träger verwendet. Der Träger kann dabei entweder vollständig optisch transparent sein oder eine optisch transparente Basis und eine optisch undurchlässige Deckschicht mit Aussparungen in den Nachweisbereichen enthalten. Geeignete Materialien für Träger sind beispielsweise Verbundstoffträger aus Metall (z. B. Silicium für die Deckschicht) und Glas (für die Basis). Derartige Träger können beispielsweise durch Aufbringen einer Metallschicht mit vorgegebenen Aussparungen für die Nachweisbereiche auf das Glas erzeugt werden. Alternativ können Plastikträger, z. B. aus Polystyrol oder Polymeren auf Acrylat- oder Methacrylatbasis eingesetzt werden.

[0021] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung zur Bestimmung von Polynukleotiden umfassend einen Träger, der mehrere separate Nachweisbereiche enthält, in denen sich jeweils ein Polynukleotid befindet, wobei das Polynukleotid in einer nicht an den Träger gebundenen Form vorliegt. Die Vorrichtung kann durch Aufbringen der Polynukleotide in die Nachweisbereiche des Trägers in Form einer Lösung, vorzugsweise einer wässrigen Lösung, und anschließendes Eintrocknen hergestellt werden. Die auf diese Weise erzeugte Vorrichtung ist für lange Zeit, z. B. mehrere Monate, stabil.

[0022] Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Bestimmung von Polynukleotiden, umfassend eine erfindungsgemäße Vorrichtung und (a) einen Satz markierter Nachweissonden oder (b) Mittel zur Herstellung eines Satzes markierter Nachweissonden, z. B. mar-

THIS PAGE BLANK (USP)¹⁴

kierte Primer oder markierte (Deoxy)ribonukleosidtriphosphate, sowie gegebenenfalls Enzyme zur Herstellung geeigneter Nachweissonden.

[0022] Das erfindungsgemäße Verfahren kann beispielsweise für die funktionelle Genomik und zur Transkriptomanalyse eingesetzt werden. 5

[0023] Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Figuren und Beispiele erläutert werden. Es zeigen:

[0024] Fig. 1 die schematische Darstellung eines zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeigneten Trägers (2) mit einer Vielzahl von in Form von Vertiefungen auf dem Träger ausgebildeten Nachweisbereichen (4). Ein Träger mit einer Fläche von 1 bis 2 cm² kann beispielweise bis zu 10⁴ Vertiefungen enthalten. 10

[0025] Fig. 2 einen Querschnitt durch einen erfindungsgemäßen Träger. Der Träger enthält eine Basis (6), vorzugsweise aus einem optisch transparenten Material wie Glas, und eine Deckschicht (8) mit Aussparungen, z. B. aus Silicium. Es sind zwei Nachweisbereiche (4a, 4b) gezeigt, die jeweils ein an einen Mikropartikel gekoppeltes Polynukleotid (10a, 10b) und eine Nachweissonde (12a, 12b) enthalten. Im Nachweisbereich (4a) findet eine Hybridisierung des Polynukleotids (10a) mit der Nachweissonde (12a) statt, während im Nachweisbereich (4b) keine Hybridisierung zwischen dem Polynukleotid (10b) und der Nachweissonde (12b) erfolgt. Der Nachweis einer Hybridisierung zwischen Mikropartikel-gekoppeltem Polynukleotid (10a) und markierter Nachweissonde (12a) kann durch Untersuchung von Einzelmolekülen erfolgen. 15

[0026] Für den Nachweis kann eine vorzugsweise unter der Trägerbasis angeordnete Detektionsvorrichtung (14) eingesetzt werden. Die Detektionsvorrichtung (14) kann einen Laser und einen Detektor enthalten. Vorzugsweise wird eine Laser-Detektormatrix bestehend aus einer Punktmatrix von Laserpunkten erzeugt durch eine Diffraktionsoptik oder einen Quanten-Well-Laser sowie einer Detektormatrix erzeugt durch fasergekoppelte einzelne Avalanche-Fotodiodendetektoren oder eine Avalanche-Fotodiodenmatrix verwendet. Alternativ kann auch eine elektronische Detektormatrix, z. B. eine CCD-Kamera eingesetzt werden. 20 25 30 35 40

Beispiel

[0027] In einer Matrix von m × n Mikrovertiefungen auf einem oder mehreren Träger(n) wird eine Bibliothek von 45 unterschiedlichen Nukleotidsequenzen der Länge m erzeugt, wobei jede Sequenz in einen separaten Nachweisbereich transferiert wird. Die Nukleotidsequenzen enthalten an ihrem 5'-Ende eine Biotingruppe und werden an Streptavidin-beschichtete Mikropartikel gekoppelt. 50

[0028] Eine mRNA- oder cDNA-Bibliothek wird durch enzymatische Reaktion, z. B. mit terminaler Transferase oder Ligase am 3'- und/oder 5'-Ende mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden versehen. Die markierten Nukleotide werden in die Vertiefungen des Trägers pipettiert. 55

[0029] Eine spezifische Hybridisierung zwischen Polynukleotid und markierter Nachweissonde erfolgt durch Analyse der Translationsbewegung unter Verwendung konfokaler Einzelmolekülanalyse. Der Nachweis erfolgt durch eine Laser-Detektormatrix. 60

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Polynukleotiden, 65 umfassend die Schritte:

(i) Bereitstellen eines Trägers, der mehrere separate Nachweisbereiche enthält, in denen sich je-

weils ein Polynukleotid befindet, wobei das Polynukleotid in einer nicht an den Träger gebundenen Form vorliegt,

(ii) Inkontaktbringen der in den Nachweisbereichen befindlichen Polynukleotide mit Nachweissonden, wobei in einzelnen Nachweisbereichen jeweils verschiedene Kombinationen von Polynukleotid und Nachweissonde vorhanden sind, und
(iii) Bestimmen einer Hybridisierung der Polynukleotide mit den Nachweissonden.

2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass man ein Polynukleotid verwendet, das an einen Mikropartikel gekoppelt ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Polynukleotide in den Nachweisbereichen ≤ 10⁻⁶ mol/l beträgt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweisbereiche ein Volumen von jeweils ≤ 10⁻⁶ l oder weniger aufweisen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger ≤ 10³ oder mehr separate Nachweisbereiche enthält.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass man eine markierte Nachweissonde verwendet.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man eine fluoreszenzmarkierte Nachweissonde verwendet.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung durch konfokale Einzelmoleküldetektion, z. B. durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie oder/und durch zeitauflöste Abklingmessung erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung eine Untersuchung der Mobilität von Polynukleotid oder/und Nachweissonde umfasst.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung eine Untersuchung des Austretens von Quench- oder Energietransfervorgängen umfasst.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung die Messung eines kreuzkorrelierten Signals umfasst, das von einem, mindestens 2 unterschiedlichen Markierungen, insbesondere Fluoreszenzmarkierungen, enthaltenden Sonden-Polynukleotidkomplex stammt.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man einen zumindest in den Nachweisbereichen optisch transparenten Träger verwendet.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger eine optisch transparente Basis und eine optisch undurchlässige Deckschicht mit Aussparungen in den Nachweisbereichen enthält.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Metall/Glas-Träger oder einen Plastikträger verwendet.

15. Vorrichtung zur Bestimmung von Polynukleotiden, umfassend:

einen Träger, der mehrere separate Nachweisbereiche enthält, in denen sich jeweils ein Polynukleotid befindet, wobei das Polynukleotid in einer nicht an den Träger gebundenen Form vorliegt.

16. Reagenzienkit zur Bestimmung von Polynukleotiden, umfassend eine Vorrichtung nach Anspruch 15 und (a) einen Satz markierter Nachweissonden oder (b)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Mittel zur Herstellung eines Satzes markierter Nachweissonden.

17. Verwendung der Vorrichtung nach Anspruch 15 oder eines Reagenzienkits nach Anspruch 16 in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14. 5

Hierzu 2 Seiten Zeichnungen.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

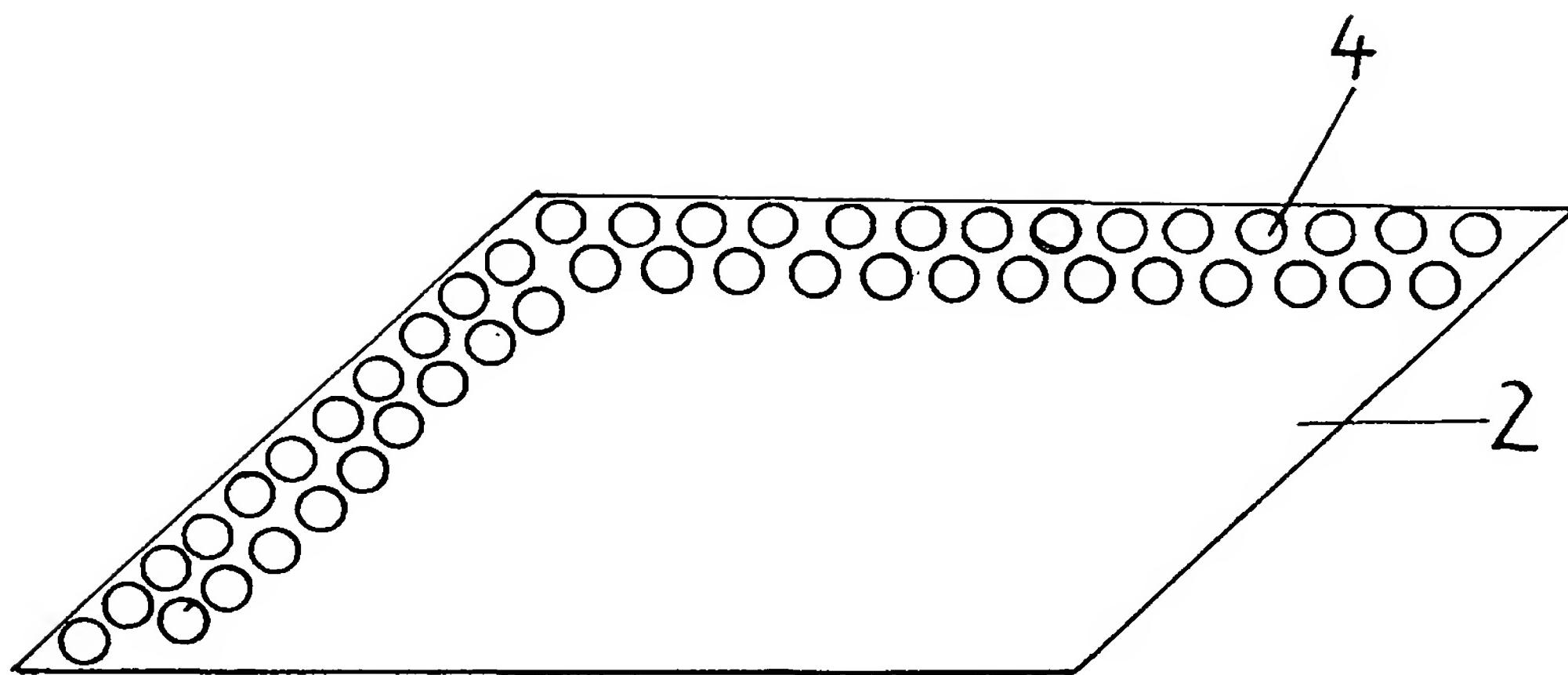
65

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- Leerseite -

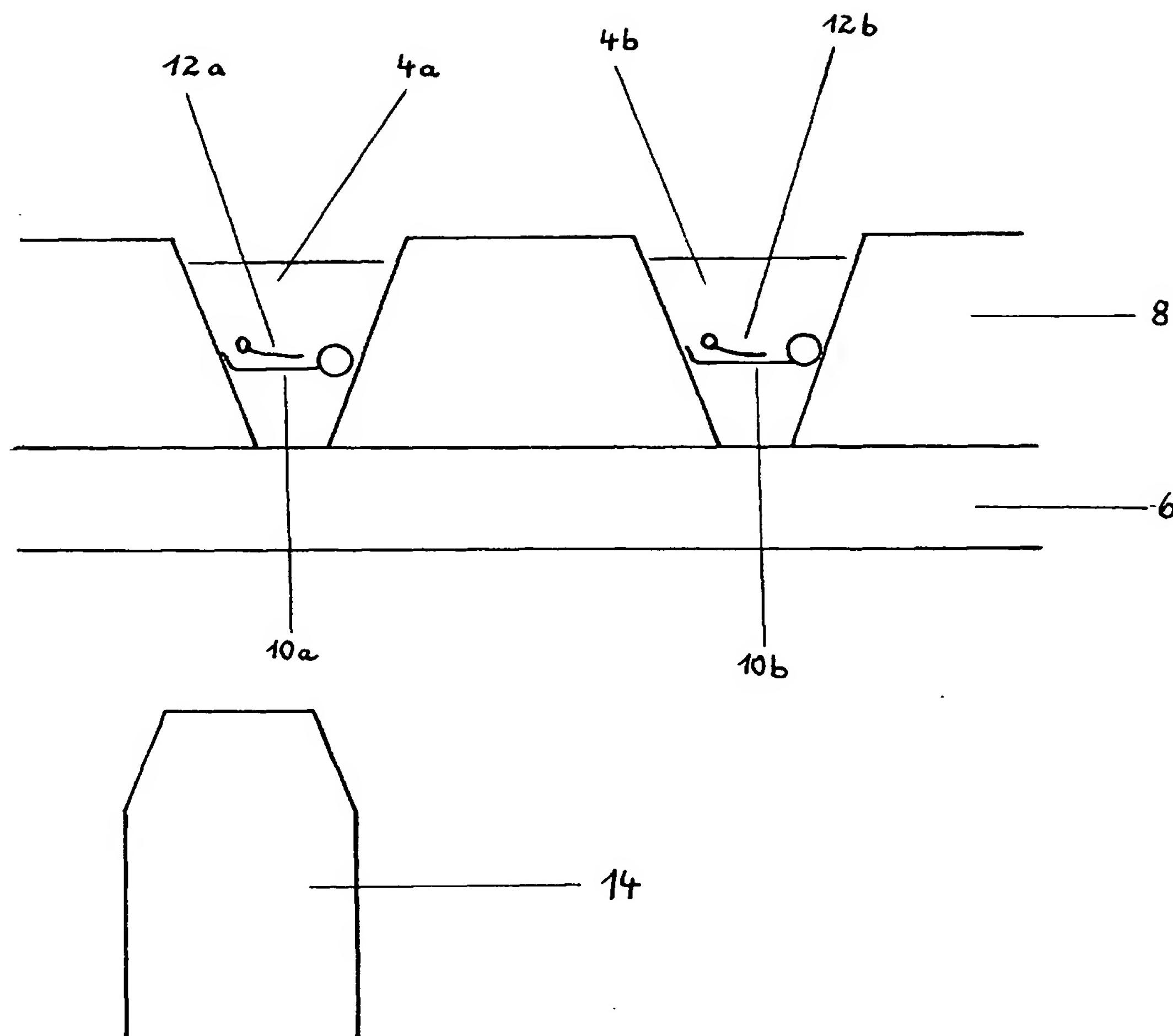
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Fig.2



THIS PAGE BLANK (USPTO)